

Using Response Surface Methodology to Explore the Best Fermentation Medium for Biocontrol Strain for Post-Harvest Diseases of Melon

Xu Cao^{1,2}, Liang Shang¹, Jingyu Chen¹, Liqiang Meng^{1,2}, Jing Li^{1,2*}

¹Institute of Microbiology of Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin Heilongjiang

²Institute of High Technology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin Heilongjiang

Email: 273325760@qq.com, *1697153371@qq.com

Received: Jul. 24th, 2020; accepted: Aug. 7th, 2020; published: Aug. 14th, 2020

Abstract

Aim: To study the best culture medium for laboratory fermentation of the biocontrol strain *Pseudomonas lutea*, which has a preventive effect on the postharvest diseases of muskmelon, and then provide high-quality resources for the application and development of microbial pesticides. **Methods:** Plackett-Burman and Box-Behnken design experiments using Design-Expert 8.0 software. **Results:** The optimal medium for laboratory fermentation of the biocontrol strain *Pseudomonas luteola*, which has antagonistic effect on the main pathogenic fungi that cause the postharvest diseases of muskmelon, was determined as: Glucose 20 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, beef extract 8.3 g/L, yeast extract 6.9 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, CaCO₃ 1 g/L.

Keywords

Fermentation, *Pseudomonas luteola*, Response Surface

利用响应面法摸索薄皮甜瓜采后病害生防菌株发酵最佳培养基

曹旭^{1,2}, 商亮¹, 陈静宇¹, 孟利强^{1,2}, 李晶^{1,2*}

¹黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨

²黑龙江省科学院高技术研究院, 黑龙江 哈尔滨

*通讯作者。

Email: 273325760@qq.com, *1697153371@qq.com

收稿日期: 2020年7月24日; 录用日期: 2020年8月7日; 发布日期: 2020年8月14日

摘要

目的: 研究对薄皮甜瓜采后病害具有防治作用的生防菌株浅黄假单胞菌的实验室发酵最佳培养基, 为微生物农药应用开发提供优质资源。方法: 采用Design-Expert 8.0软件的Plackett-Burman及Box-Behnken设计试验。结果: 确定了对引起薄皮甜瓜采后病害主要病原真菌具有拮抗作用的生防菌株浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)实验室发酵的最佳培养基为: 葡萄糖20 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, 牛肉膏8.3 g/L, 酵母膏6.9 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, CaCO₃ 1 g/L。

关键词

发酵, 浅黄假单胞菌, 响应面

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黑龙江省是我国薄皮甜瓜主要生产基地, 由于生产上市期过于集中, 形成短期积压, 极易受采后致腐性真菌感染腐烂变质, 成为我国薄皮甜瓜销售储运产业的严重障碍[1] [2]。且甜瓜采后病害在世界各甜瓜产区均有发生已为全球性问题[3], 亟待研究解决。

目前, 化学杀菌剂是防治果蔬采后病害的主要方法[4], 但随着当今社会对健康问题逐步关注, 以及绿色食品知识的普及和农药残留问题的突出[5], 使得探寻一种安全有效抑制果蔬采后腐烂的方法变得尤为重要, 而采后病害生物防治技术能减少甜瓜储藏运输期间的变质, 为无毒、无农药残留的采后病害控制提供了一种重要的方法[6] [7] [8]。

笔者前期已筛选到一株具有防治薄皮甜瓜采后病害的生防菌株[9], 而为了将“绿色防腐”技术应用于薄皮甜瓜采后病害的防治实践当中, 本研究将探索其最佳的发酵培养基, 意为人们提供品质优良、绿色安全、可延长保存期的生防菌剂。

2. 材料与方法

2.1. 供试菌株

浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*) C3 [9]由黑龙江省生物工程重点实验室自薄皮甜瓜表面分离。

2.2. 培养基

发酵初始培养基: 葡萄糖 10 g/L, 牛肉膏 8 g/L, 酵母膏 5 g/L, pH 7.2~7.5。湿热灭菌: 121℃, 20 min。将浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*) C3 接于装液量 20 mL 的 250 mL 容量的三角瓶培养基中, 30℃、90 r/min、15 h 培养。再以 2%接种量接种于装液量 50 mL 的三角瓶发酵培养基中, 30℃、160 r/min 培养 20 h。

利用平板菌落计数法,将发酵液按梯度稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} ,取 $10\ \mu\text{L}$ 涂布,置于 30°C 培养,将个数在30~300之间的菌落个数视为有效值即响应值,其中每毫升菌液中活菌的个数(cfu/mL)=同一稀释度3次重复的平均菌落数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$ /取样量。

2.3. Plackett-Burman 设计筛选影响菌体浓度的显著性因子

筛选基础发酵培养基中的显著因子,对影响菌株发酵浓度的最佳组成的6个因子,即葡萄糖(X_1)、 MgSO_4 (X_2)、牛肉膏(X_3)、酵母膏(X_4)、 K_2HPO_4 (X_5)、 CaCO_3 (X_6),进行全面考察。选择6因子2水平的试验设计,每个因子取高低两个水平,且高水平是低水平的2倍,见表1,拟合方程为:

$$W = \gamma_0 + \gamma_1 X_1 + \gamma_2 X_2 + \gamma_3 X_3 + \gamma_4 X_4 + \gamma_5 X_5 + \gamma_6 X_6$$

Table 1. Factors and levels of Plackett-Burman design

表 1. Plackett-Burman 设计因子与水平

符号	因子	水平(g/L)	
		-	+
X_1	葡萄糖	10	20
X_2	MgSO_4	0.2	0.4
X_3	牛肉膏	5	10
X_4	酵母膏	5	10
X_5	K_2HPO_4	0.5	1
X_6	CaCO_3	0.5	1

2.4. 最陡爬坡实验

确定影响菌株发酵浓度的显著性因子,根据回归方程各因子的系数来明确主要因子的爬坡路径和步长[7],以快速逼近曲面的稳定点区域。

2.5. 响应面实验设计

通过 Plackett-Burman 实验确定影响菌株 C3 发酵菌体浓度的主要因素,进而由最陡爬坡实验逼近影响菌体发酵浓度响应面稳定区域。利用 Box-Behnken 中心组合设计方法,在主要因子的响应区分别取3个水平,设计一个3因素3水平的响应面分析试验。

2.6. 数据分析

每处理中含有3个平行试验,取平均值。运用 Design-Expert 8.0 完成 Plackett-Burman 设计、Box-Behnken 设计的响应面分析。

3. 结果与分析

3.1. 影响菌体浓度的显著性因子

采用 Plackett-Burman 设计对主要因素的6个因子进行考察,各组分别取高水平(+1)和低水平(-1),见表2;各因子水平方差分析结果见表3。

Table 2. Plackett-Burman design and response results**表 2.** Plackett-Burman 设计及响应值

序号	A	B	C	D	E	F	活菌数(10^8 cfu/mL)
1	-1	-1	-1	1	-1	1	3.8
2	1	-1	1	1	-1	1	4.6
3	1	1	1	-1	-1	-1	6.1
4	1	-1	1	1	1	-1	4.7
5	-1	-1	1	-1	-1	1	4.7
6	-1	1	1	-1	1	1	5.1
7	-1	1	1	1	-1	-1	3.5
8	-1	1	-1	1	1	-1	3.3
9	1	1	-1	-1	-1	1	5.4
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.0
11	1	-1	-1	-1	1	-1	5.7
12	1	1	-1	1	1	1	3.9

Table 3. The levels of Plackett-Burman and analysis of variance for regression model**表 3.** Plackett-Burman 实验水平及回归模型方差分析

因素来源	平方和	均方	F	p-value Prob > F	重要性
Model	7.89	1.31	7.68	0.0205	
X ₁ -葡萄糖	3	3	17.51	0.0086	2
X ₂ -MgSO ₄	0.01	0.01	0.019	0.8945	5
X ₃ -牛肉膏	0.56	0.56	3.28	0.1295	3
X ₄ -酵母膏	4.32	4.32	25.21	0.0040	1
X ₅ -K ₂ HPO ₄	0	0	0	1.0000	6
X ₆ -CaCO ₃	0.01	0.01	0.019	0.8945	4

由表 3 可知,培养基中各因子菌株对 C3 发酵液活菌浓度影响的重要性排序为: $X_4 > X_1 > X_3 > X_6 > X_2 > X_5$ 。即酵母膏、葡萄糖和牛肉膏的影响比较明显,酵母膏对于菌体数量呈现负效应,而葡萄糖和牛肉膏呈正效应。即 $W = 4.25 + X_1 - 0.03X_2 + 0.87X_3 - 2.4X_4 + 2.56 \times 10^{-14} X_5 + 0.67X_6$, 方程 $R^2 = 0.9021$, 表明该回归方程拟合良好。从方程中还可以看出,要提高菌体数量,应适当降低酵母膏添加量,提高葡萄糖和牛肉膏添加量。

3.2. 最陡爬坡试验研究最大响应值的响应区域

利用爬坡实验快速逼近最大响应值稳定响应区,根据 Plackett-Burman 试验设计筛选出的主要组分的效应大小设计步长,进行最陡爬坡试验设计,寻找最优菌数。如表 4 所示,第 2 组试验发酵菌体浓度最大,即当葡萄糖浓度为 17.5 g/L,牛肉膏浓度为 8 g/L,酵母膏浓度为 6.5 g/L 时发酵菌液浓度达到最大值,故以此为中心点进行响应面试验分析。

Table 4. Steepest ascent procedure and corresponding results**表 4.** 最陡爬坡试验设计及结果

试验号	葡萄糖(g/L)	牛肉膏(g/L)	酵母膏(g/L)	活菌数(10^8 cfu/mL)
1	15	7.5	7.5	3.3
2	17.5	8	6.5	5.4
3	20	8.5	5.5	4.2
4	22.5	9	4.5	3.1
5	25	9.5	3.5	2.4

3.3. 响应面试验数据分析

根据爬坡试验结果,采用 Box Behnken 模型,以葡萄糖、牛肉膏和酵母膏为主要考察因子,以+1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平,以发酵液活菌数为响应值,通过响应曲面分析(RSM)进行培养基主要成分的优化。因子编码及水平如下,见表 5。

Table 5. Factors and levels of Box-Behnken design**表 5.** Box-Behnken 设计因子代码与水平

符号	因子	水平(g/L)		
		-1	0	1
E	葡萄糖	15	17.5	20
F	牛肉膏	7.5	8	8.5
G	酵母膏	5.5	6.5	7.5

通过 Box Behnken 模型进行三因素三水平试验设计,见表 6。利用 Design Expert 8.0 软件对试验数据进行多元回归拟合,得到了菌体数量为响应值 Y 对葡萄糖 E 、牛肉膏 F 、酵母膏 G 的二次多项回归模型方程为:

$$Y = -195.35 - 27.85E + 464.75F + 105.88G + 26EF + 23EG + 5FG - 2.2E^2 - 315F^2 - 113.75G^2$$

Table 6. Box Behnken design and response values**表 6.** Box Behnken 模型设计和响应值

试验号	E	F	G	活菌数(10^8 cfu/mL)
1	-1	-1	0	4.2
2	1	-1	0	3.7
3	-1	1	0	4.4
4	-1	0	-1	5.2
5	0	0	0	4.3
6	1	0	-1	3.2
7	-1	0	1	3.7
8	1	0	1	4.9
9	0	-1	-1	2.7
10	0	1	-1	3.7

Continued

11	0	-1	1	3
12	0	1	1	4.1
13	0	0	0	5.6
14	0	0	0	5.6
15	0	0	0	5.2
16	0	0	0	4.9
17	0	0	0	5.2

Box Behnken 设计的方差分析见表 7, 模型的拟合度可通过决定系数来衡量, Joglekar 和 May 建议, 一个好的模型, 决定系数至少为 0.80, 该模型的决定系数为 0.9691, 且回归模型极显著($p < 0.01$), 因此, 该模型能充分地表明各因素之间的关系。

Table 7. Analysis of variance of the regression parameters for Box Behnken design model
表 7. Box Behnken 模型设计方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 Prob > F	显著性
模型	12.71	9	1.412255	24.41	0.0002	**
E-葡萄糖	0.02	1	0.02	0.35	0.5750	
F-牛肉膏	1.81	1	1.81	31.20	0.0008	**
G-酵母膏	0.41	1	0.41	7	0.0331	*
EF	0.42	1	0.42	7.30	0.0305	*
EG	1.32	1	1.32	22.86	0.0020	**
FG	0.01	1	0.01	0.04	0.8412	
E ²	0.08	1	0.08	1.38	0.2792	
F ²	2.61	1	2.61	45.13	0.0003	**
G ²	5.46	1	5.46	94.16	<0.0001	**
残差	0.41	7	0.06			
失拟项	0.05	3	0.02	0.17	0.9136	
纯误差	0.36	4	0.09			
总回归	13.12	16				
决定系数 R ²	0.9691					
校正决定系数 AdjR ²	0.9294					

注: $p < 0.0100$ 极显著(**); $p < 0.0500$ 显著(*); $p > 0.0500$ 不显著。

根据方差分析和回归方程系数显著性检验的结果, 将差异不显著的因子剔除后得到的回归方程为:

$$Y = -195.35 + 464.75F + 105.88G + 26EF + 23EG - 315F^2 - 113.75G^2$$

由表 7 方差分析可知, 失拟项 $P = 0.9136 > 0.05$, 差异不显著, 说明残差由随机误差引起; 复相关系数 R 为 0.9844, 表明实测值和预测值高度相关; R^2 为 0.9691, 拟合度 > 90%, 说明模型能够反应响应值变化, 试验误差小, 可以用此模型培养基主要成分进行分析和预测。

3.3.1. 自变量对响应值的影响

回归方程的回归系数影响菌体数量, 由表 7 可知, F、G、EF、EG、F²、G² 项对菌体数量有显著影响, 其他因素影响不显著。回归方程一次项的回归系数绝对值大小依次为 F、G、E, 表明牛肉膏添加量对菌数的影响最大, 其次为酵母膏添加量、葡萄糖添加量。

3.3.2. 葡萄糖添加量与牛肉膏添加量对菌体数量的影响

由图 1 可知, 葡萄糖添加量与牛肉膏添加量对菌体数量的交互作用。当其他条件一定时, 菌体数量随着葡萄糖添加量的提高而下降, 随着牛肉膏添加量的提高呈现先上升后下降的趋势, 当葡萄糖添加量在 15 g/L、牛肉膏添加量在 8 g/L 附近时菌体数量达到最大, 此时牛肉膏添加量对菌体数量的影响极显著 ($p < 0.01$), 葡萄糖添加量影响不显著 ($p > 0.05$), 两者交互作用显著 ($0.05 < p < 0.01$)。这是因为 15 g/L 葡萄糖能够提供菌体生长的 C 源, 过多的葡萄糖反而抑制菌体生长。

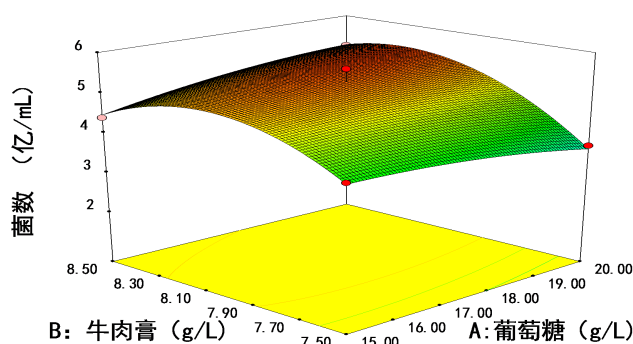


Figure 1. Response surface plot of cell number versus glucose and beef extract
图 1. 葡萄糖与牛肉膏交互作用对菌体数量影响的响应面

3.3.3. 葡萄糖添加量和酵母膏添加量对菌体数量的影响

由图 2 可知, 葡萄糖添加量与酵母膏添加量对菌数的交互作用。在一定条件下, 菌数随着酵母膏添加量提高呈现先上升后下降的趋势, 当葡萄糖添加量大于 17.5 g/L 时, 菌体数量的增长趋于平缓, 随着葡萄糖添加量的提高呈现下降的趋势, 葡萄糖添加量、酵母膏添加量交互作用极显著 ($p < 0.01$), 酵母膏添加量对菌数的影响显著 ($0.01 < p < 0.05$)。

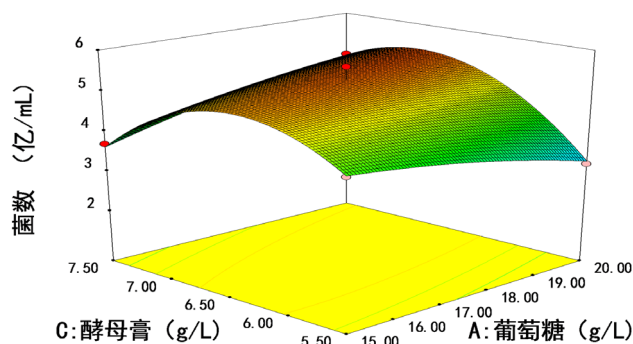


Figure 2. Response surface plot of cell number versus glucose and yeast extract
图 2. 葡萄糖和酵母膏对菌体数量影响的响应面

3.3.4. 牛肉膏添加量和酵母膏添加量对菌体数量的影响

由图 3 可知, 牛肉膏添加量和酵母膏添加量对菌体数量的交互作用。当其他条件一定时, 菌体数量

随着牛肉膏添加量和酵母膏添加量的提高呈现先上升后下降的趋势,当牛肉膏添加量在 8 g/L、酵母膏添加量在 6.5 g/L 附近时菌体数量达到最大,牛肉膏添加量对菌数的影响极显著($p < 0.01$),酵母膏添加量对菌数的影响显著($0.01 < p < 0.05$),两者交互作用不显著($p > 0.05$)。

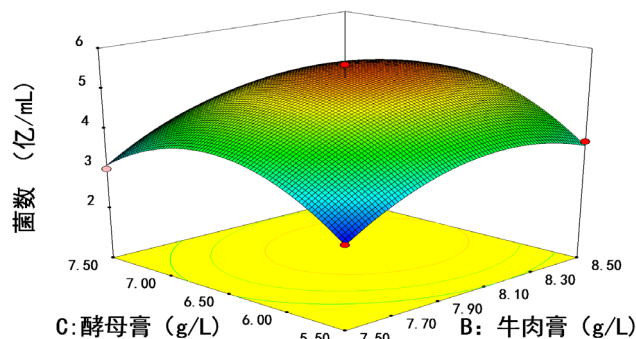


Figure 3. Response surface plot of cell number versus yeast extract and beef extract
图 3. 牛肉膏和酵母膏对菌体数量影响的响应面

3.3.5. 最佳条件的确定与验证

通过 Design Expert 7.0 软件分析,得出培养基主要成分添加量为:葡萄糖 20 g/L,牛肉膏 8.3 g/L,酵母膏 6.9 g/L,预测最优值为 5.56×10^8 cfu/mL。3 次重复试验以优化,其检测结果为 5.4×10^8 cfu/mL,与真实值的相对误差为 $2.88\% < 5\%$,表明所优化的最佳条件合理可靠的,验证了所建模型的正确性。故,浅黄假单胞菌 C3 菌株的最优培养基配方为:葡萄糖 20 g/L, MgSO_4 0.2 g/L,牛肉膏 8.3 g/L,酵母膏 6.9 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, CaCO_3 1 g/L。

4. 讨论与结论

在优化培养基的过程中,Plackett-Burman 设计能够从繁密的培养基组成成分中选择出对目标产物影响较为明显的因子,而响应面分析法能够同时对响应值的几个变量进行回归分析,可以阐明多种因素之间的交互作用,并且可以根据回归方程推算响应值的最优值。而今,全球众多学者采用此方法对各种微生物培养基尝试了优化,均获得了较为理想的实验结果。

利用 Plackett-Burman 设计,在浅黄假单胞菌 C3 的基础发酵培养基中筛选出 3 个显著因子,分别是葡萄糖(X_1)、牛肉膏(X_3)和酵母膏(X_4),以爬坡实验迅速逼近最大响应值的稳定响应区,再运用 Box-Behnken 设计得出 3 个显著因子的最优配比,最终明确最优培养基配方为:葡萄糖 20 g/L, MgSO_4 0.2 g/L,牛肉膏 8.3 g/L,酵母膏 6.9 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, CaCO_3 1 g/L。通过验证实验检测结果为 5.4×10^8 cfu/mL 与预测值相近,明确得出该模型拟合实验结果的有效性和准确性。

对引起薄皮甜瓜采后病害主要病原真菌具有拮抗作用的生防菌株浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)实验室发酵的最佳培养基为:葡萄糖 20 g/L, MgSO_4 0.2 g/L,牛肉膏 8.3 g/L,酵母膏 6.9 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, CaCO_3 1 g/L。

基金项目

黑龙江省应用技术研究开发与计划项目(GZ13B011)。

参考文献

- [1] 田世平,罗云波,王贵禧.园艺产品采后生物学基础[M].北京:科学出版社,2011:224-225.

-
- [2] 郭达伟. 果蔬保鲜剂的应用研究[J]. 中国农学通报, 2001, 17(3): 62-63.
- [3] Janisiewicz, W.J. and Conway, W.S. (2010) Combining Biological Control with Physical and Chemical Treatments to Control Fruit Decay after Harvest. *Stewart Postharvest Review*, **6**, 1-16. <https://doi.org/10.2212/spr.2010.1.3>
- [4] 胡俊. 微生物学实验技术[M]. 呼和浩特: 内蒙古文化出版社, 2001 .
- [5] 范青. 果实采后病害生物防治及其机理研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2001.
- [6] Pusey, P.L. and Wilson, C.L. (1984) Postharvest Biological Control of Stone Fruit Brown Rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, **68**, 753-756. <https://doi.org/10.1094/PD-69-753>
- [7] Wang, W., Tang, W.H., Hang, Y., *et al.* (2000) Investigation and Biological Control of Postharvest Diseases of Muskmelon. Quality Assurance in Agriculture Produce. *ACIAR Proceedings*, Canberra.
- [8] Spadaro, D. and Gullino, M.L. (2004) State of the Art and Future Prospects of the Biological Control of Postharvest Fruit Diseases. *International Journal of Food Microbiology*, **91**, 185-194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)
- [9] 曹旭, 李晶, 等. 薄皮甜瓜采后病害生防菌株的筛选及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(12): 3552-3554.